

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 14, 1976, pp. 333–337

Die Bestimmung der Cystinaminopeptidase (Oxytocinase) mit einem ENI-Fast-Analyzer¹⁾

Von H. Wisser, K. Dettmer und E. Knoll

Abteilung für Klinische Chemie, Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart

Zusammenfassung: Ein Verfahren zur Bestimmung der Cystinaminopeptidase-Aktivität wurde auf einen Fast-Analyzer adaptiert. Die verschiedenen Reaktionsparameter wurden überprüft. Die Präzision des Verfahrens liegt bei etwa 5%. Die Cystinaminopeptidase-Aktivität bleibt auch bei längerer Aufbewahrung bei + 4°C und – 20°C stabil. An einer Stichprobe von Patientinnen mit normalem Schwangerschaftsverlauf wurde der Normbereich für die letzten Schwangerschaftswochen bestimmt.

The determination of cystine aminopeptidase (oxytocinase) with a ENI fast analyzer

Summary: A procedure for the determination of cystine aminopeptidase activity was adapted to a fast analyzer. The various reaction parameters were checked. The precision of the method was about 5%. Cystine aminopeptidase activity was stable for long storage periods at + 4°C and – 20°C. The normal range for the terminal weeks of pregnancy was determined on samples from female patients with normal pregnancies.

Einleitung

Die Herkunft der aus mehreren Isoenzymen bestehenden Cystinaminopeptidase (EC 3.4.11.3) aus der Placenta konnte durch histochemische und immunhistochemische Verfahren nachgewiesen werden. In der Schwangerschaft steigt die Cystinaminopeptidase-Aktivität des Serums an. Über die Bedeutung ihrer Bestimmung als Parameter zur Erkennung einer Störung der foetoplacentaren Einheit liegen bisher widersprüchliche Angaben vor (Übersicht s. l. c. (1)). Die Cystinaminopeptidase-Aktivität wurde mit verschiedenen Substraten, Naphthyl- und *p*-Nitrophenylamiden des Cysteins bzw. Cystins, sowohl kinetisch als auch durch Endpunktbestimmung ermittelt (2–9). In Anlehnung an die Untersuchungen von Oudheusden (4, 5) und Tovey et al. (7) wurde das Verfahren auf den ENI-Fast-Analyzer²⁾ adaptiert, mit dem Ziel, ein einfaches, schnelles Verfahren guter Präzision zur Bestimmung der Cystinaminopeptidase-Aktivität zu entwickeln. Die Bestimmung soll in einer Studie über die Wertigkeit verschiedener Parameter zur Erkennung einer Störung der foetoplacentaren Einheit eingesetzt werden. Die Verwendung von *S*-Benzyl-*L*-cystein-*p*-nitroanilid als Substrat hat den Vorteil, daß es sehr schnell gespalten wird.

Methodik

Die Cystinaminopeptidase (Oxytocinase) katalysiert die Hydrolyse des *S*-Benzyl-*L*-cystein-*p*-nitroanilids. Die nach einer bestimmten Zeit freigesetzte *p*-Nitroanilinmenge ist proportional der Cystinaminopeptidase-Aktivität und kann durch Messung der Absorption des *p*-Nitroanilins bei 405 nm gemessen werden.

Geräte

Fast-Analyzer mit Rotoloader²⁾

Reagenzien und Lösungen

1. Substratlösung (7,55 mmol/l)
25 mg *S*-Benzyl-*L*-cystein-*p*-nitroanilid³⁾ werden in 10 ml Methoxyethanol (Ethylenglykolmonomethyläther) (Merck Nr. 859) gelöst. In dunkler Flasche bei 4–6°C aufbewahrt etwa einen Monat haltbar.
2. Phosphatpuffer 0,1 mol/l, pH 7,3
13,61 g KH₂PO₄ (Merck Nr. 4873) werden in etwa 900 ml bidest. Wasser gelöst, mit 1 mol/l Natronlauge auf pH 7,3 eingestellt und auf 1 Liter aufgefüllt.
3. 0,15 mol/l NaCl-Lösung

Arbeitsweise

500 µl Phosphatpuffer, 50 µl Probe und 100 µl Natriumchloridlösung (als Spülflüssigkeit) werden mit dem Rotoloader pipettiert. 50 µl Substratlösung werden mit einer Eppendorf-Pipette pipettiert, da die normalen Zufuhrschläuche der Pumpen durch

¹⁾ Diese Arbeit wurde unterstützt aus Mitteln der Robert-Bosch-Stiftung, Stuttgart.

²⁾ Firma Electro Nucleonics, Stuttgart.

³⁾ Herrn Dr. Lang, Biochemische Forschung der Firma Merck, danken wir für die Überlassung einer größeren Menge dieser Substanz.

den Ethylenglykolmonomethyläther angegriffen werden. In Position 1 wird Wasser, in die Positionen 2 und 3 Kontrollen und in die Positionen 4–16 Patientenproben pipettiert.

Pipettierung

500 µl Puffer in Position C
50 µl Probe in Position C
100 µl NaCl-Lösung in Position C
50 µl Substrat in Position B mit Eppendorf-Pipetten

Meßbedingungen

Filter 405 nm (Filter-Range 385–430 nm)
Erste Messung 120 s
Meßintervall: 60 s
Anzahl der Messungen: 4
Umrechnungsfaktor 1414
Meßtemperatur 25°C

Ergebnisse und Diskussion

Verschiedene Parameter, die von Einfluß auf die Bestimmung sind, wurden variiert. Über die Ergebnisse wird im folgenden berichtet.

1. Methoxyethanolkonzentration

Von verschiedenen Untersuchern (3, 4, 5, 7) wurde zur Erhöhung der Löslichkeit des Substrates dem Reagenzgemisch Methoxyethanol zugesetzt. Neben der Löslichkeitserhöhung wurde eine Aktivitätssteigerung beobachtet, allerdings nur in einem gewissen Konzentrationsbereich. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Tovey et al. (7) fanden wir bei Verwendung des gleichen Substrates ebenfalls die größte Aktivitätssteigerung bei einer Endkonzentration des Methoxyethanols von 80–100 ml/l und über 120 ml/l einen Aktivitätsabfall.

2. pH-Optimum und Konzentration des Phosphatpuffers

Die Überprüfung der pH-Abhängigkeit der Cystinaminopeptidase-Aktivität ergab ein pH-Optimum zwischen pH 7,2–7,5 des Phosphatpuffers. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Untersucher (5, 7) überein. Neben dem pH-Wert wurde der Einfluß der Konzentration des Puffers untersucht. Dabei ist bis zu einer Konzentration von 0,1 mmol/l (pH 7,3) die Aktivität unverändert. Bei höheren Konzentrationen nimmt die Aktivität ab (Abb. 1).

3. Substratkonzentration

Die Ermittlung der optimalen Substratkonzentration ist insofern schwierig, da es bei einer Substratkonzentration zwischen 0,54 und 0,94 mmol/l Ansatz trotz Lösungsvermittlerzusatz zu einer Ausfällung des Substrats kommt. Die Abhängigkeit der Aktivität von der steigenden Substratkonzentration ist in folgender Abbildung 2 wiedergegeben.

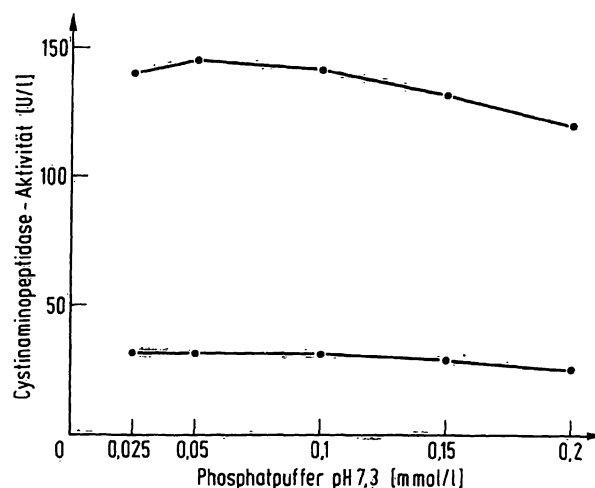


Abb. 1. Einfluß der Konzentration des Phosphatpuffers auf die Cystinaminopeptidase-Aktivität.

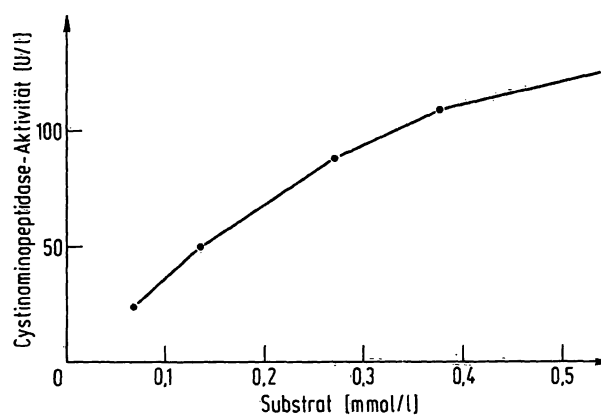


Abb. 2. Abhängigkeit der Cystinaminopeptidase-Aktivität von der Substratkonzentration im Ansatz.

4. Linearität

Es wurde geprüft, ob eine lineare Abhängigkeit von Aktivität und Enzymkonzentration besteht. Dazu wurde ein Schwangerenserum mit hoher Cystinaminopeptidase-Aktivität mit Nichtschwangerenserum unterschiedlich verdünnt und in den Verdünnungen die Cystinaminopeptidase-Aktivität bestimmt. Wie die Abbildung 3 zeigt, besteht für den untersuchten Konzentrationsbereich eine lineare Abhängigkeit von Aktivität und Konzentration.

In einer jüngst erschienenen Publikation (10) wird auf Störungen beim Bestimmungsverfahren mit dem „Enzyrator“ hingewiesen. Diese bestanden in einer Abnahme der Aktivität während der ersten 2–3 Minuten, dann einer konstanten Aktivität und schließlich einer erneuten Abnahme. Das Ausmaß dieser Störung war abhängig von der Enzymaktivität.

Diese Befunde können wir nach unseren Ergebnissen nur zum Teil und auch nicht in dem Ausmaß, wie sie in Abbildung 1 der erwähnten Publikation (10) wiedergegeben sind, bestätigen. Vier Seren unterschiedlicher Aktivität,

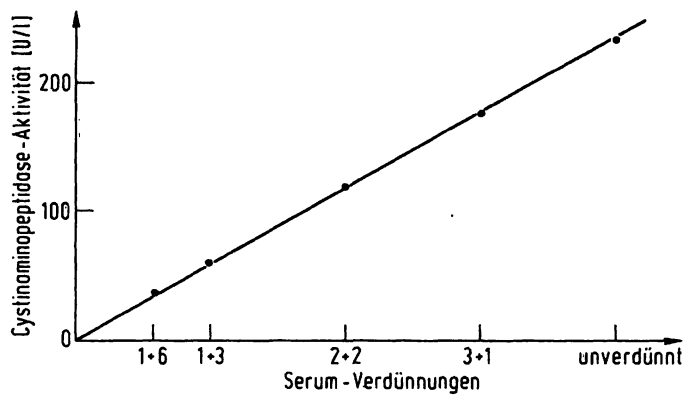


Abb. 3. Cystinaminopeptidase-Aktivität bei steigender Verdünnung des gleichen Serums mit Nichtschwangerenserum.

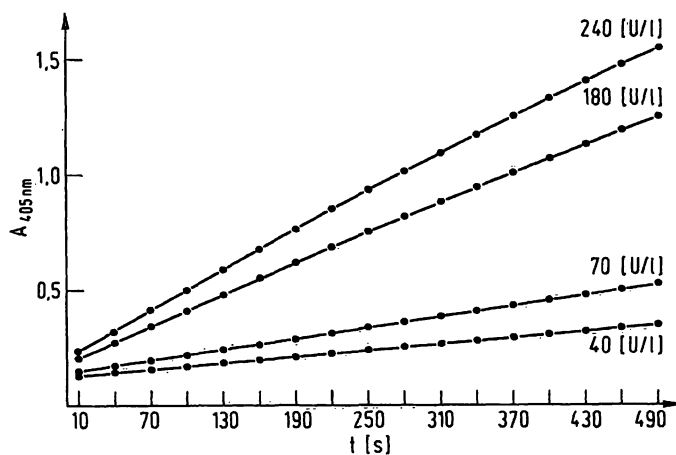


Abb. 4. Zeitverlauf der Absorptionszunahme bei Analyse von 4 Seren unterschiedlicher Aktivität.

die von uns untersucht wurden, zeigen bis zu einer Reaktionszeit von 250 s eine lineare Abhängigkeit von Absorption und Konzentration (Abb. 4). Bei den Seren mit den beiden höchsten Enzymaktivitäten macht sich nach dieser Zeit eine leichte Krümmung bemerkbar. Dies könnte durch einen Hemmeffekt des freigesetzten *p*-Nitroanilins bedingt sein (10). Man wird diesen Effekt bei Aktivitäten von 180 U/l und mehr berücksichtigen müssen, indem man das Meßintervall von 60 s auf 30 s verkürzt.

Stabilität des Enzymes

Zur Frage der Konstanz der Cystinaminopeptidase-Aktivität war es erforderlich, zu prüfen, wie diese sich unter verschiedenen Versuchsbedingungen verhält. Dazu wurden 10 verschiedene Seren von Schwangeren über einen Zeitraum von 21 Tagen bei Aufbewahrung der Proben bei +4°C und -20°C analysiert. Um die Meßergebnisse der Proben unterschiedlicher Aktivität mitteln zu können, wurde die prozentuale Abweichung des einzelnen Meßwertes vom Ausgangswert berechnet.

Die Meßwerte der 10 verschiedenen Seren für den gleichen Zeitpunkt wurden anschließend gemittelt und die zugehörige Standardabweichung berechnet. Wie die Ergebnisse in Abbildung 5 zeigen, ist die Enzymaktivität über einen Zeitraum von 21 Tagen für beide Aufbewahrungstemperaturen stabil. Die Aufbewahrung bei Raumtemperatur zeigte innerhalb von 24 Stunden keinen Aktivitätsabfall.

Präzision

Zur Bestimmung der Präzision des Verfahrens wurden über einen Zeitraum von 4 Monaten selbst hergestellte Kontrollproben analysiert. Letztere wurden hergestellt, indem aliquote Teile eines gut gemischten Schwangerenpoolserums tiefgefroren und bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt wurden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

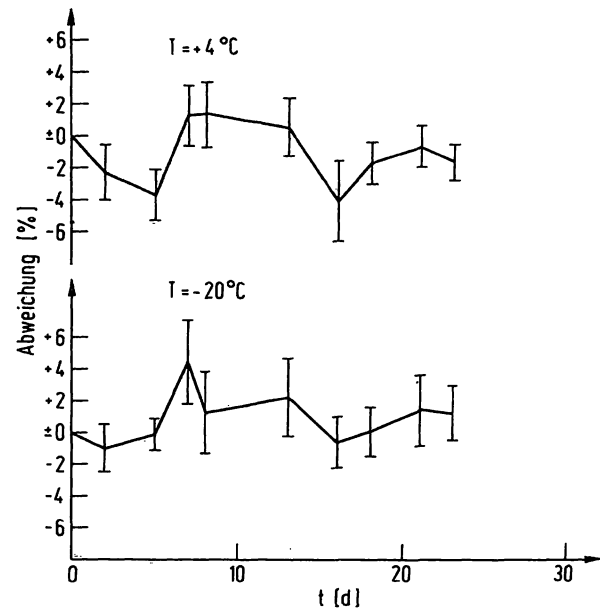


Abb. 5. Mittlere Abweichung der Cystinaminopeptidase-Aktivität von dem Ausgangswert bei unterschiedlichen Aufbewahrungstemperaturen in Abhängigkeit von der Zeit.

Tab. 1. Ergebnisse der statistischen Qualitätskontrolle der Bestimmung der Cystinaminopeptidase-Aktivität mit selbst hergestellten Kontrollproben.

s_s , V_s = Standardabweichung und Variationskoeffizient in der Serie,
 s_T , V_T = von Tag zu Tag.

Monat	\bar{x} (U/l)	s_s (U/l)	V_s (%)	s_T (U/l)	V_T (%)	n
Januar	122	3,0	2,4	4,1	3,3	4
Februar	123	2,5	2,1	3,8	2,6	8
März	123	2,3	1,9	1,3	1,0	6
April	117	2,1	1,8	5,9	5,1	6
	121	2,5	2,1	4,1	3,4	24

Die Streuung in der Serie wurde aus der Differenz von Doppelbestimmungen ermittelt. Die Streuung in einem Lauf des Fast-Analyzers betrug 1,8% ($\bar{x} = 77$ U/l, $s = 1,4$ U/l, $n = 15$). Die Ergebnisse bestätigen die hohe Präzision des Verfahrens. Die Konstanz der Mittelwerte ist ein weiterer Beweis für die Stabilität des Enzyms.

Richtigkeit

Nach Untersuchungen verschiedener Autoren werden die unterschiedlichen Substrate, die für die Bestimmung der Cystinaminopeptidase-Aktivität benutzt werden, von Amino-peptidasen gespalten, die im Serum von Nichtschwangeren vorkommen. Zur Überprüfung dieser Frage wurden 5 verschiedene Seren von Männern analysiert. Die dabei gemessenen Werte betrugen 1–3 U/l. Dieser Versuch zeigt auch, daß Fehler durch Spontanhydrolyse des Substrates vernachlässigbar klein sind. Die Bestimmung der Spontanhydrolyse durch Zugabe von bidest. Wasser anstatt des Serums war nicht möglich, da es dabei durch Ausfällung des Substrates im Reaktionsansatz zu Trübungen kam.

Um einen Hinweis auf die Spezifität der Reaktion bzw. eine mögliche unspezifische Erhöhung der gemessenen Cystinaminopeptidase-Aktivität zu bekommen, wurde in Seren von nichtschwangeren Patientinnen mit mechanischem Ikterus, die eine erhöhte Alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1) und Leucinaminopeptidase (EC 3.4.11.1) hatten, die Cystinaminopeptidase-Aktivität bestimmt (Tab. 2).

Tab. 2. Cystinaminopeptidase-Aktivität von nichtschwangeren Patientinnen bei erhöhter Alkalischer Phosphatase und Leucinaminopeptidase.

Patient	Alkalische Phosphatase (U/l)	Leucinamino-peptidase (U/l)	Cystinamino-peptidase (U/l)
1	2550	162	10
2	462	54	8
3	536	47	13
4	637	71	20
5	1405	78	13
6	734	86	19
7	908	122	14
8	1317	119	9
9	370	47	24

Wie die Ergebnisse zeigen, ist ein Störeinfluß durchaus vorhanden. Allerdings dürfte er am Ende der Schwangerschaft nicht ins Gewicht fallen.

Normalwerte

Zur Ermittlung vorläufiger Normalwerte wurden die bisherigen Messungen an schwangeren Patientinnen nach Ausschluß pathologischer Schwangerschaften verwandt (Tab. 3).

Wie die tabellarische Darstellung zeigt, nimmt die Aktivität der Cystinaminopeptidase in den letzten Schwangerschaftswochen zu. Wegen der Größe der biologischen Varianz ist eine transversale Betrachtung für die Beurteilung weniger von Nutzen als die longitudinale Betrachtung. Letztere erfordert wiederholte Bestimmungen in bestimmten Zeitabständen.

Inwieweit die Oxytocinase-Bestimmung als Parameter der foetoplacentaren Einheit von klinischer Relevanz ist, konnte aus den uns zur Verfügung stehenden Daten wegen ihrer häufigen Unvollständigkeit bzw. zu wenigen Kontrollen nicht entschieden werden. Die Literaturangaben sind, wie Kuss (1) in seiner Übersicht ausführt, sehr widersprüchlich. Aus diesem Grunde ist eine prospektive Studie geplant, bei der Human-Plazenta-Lactogen, Cystinaminopeptidase, Oestriol im Serum und die Oestriol-Ausscheidung im Urin bei einer Stichprobe schwangerer Patientinnen ab der 20. Schwangerschaftswoche bestimmt werden sollen.

Tab. 3. Cystinaminopeptidase-Aktivität im Verlauf der letzten Schwangerschaftswochen.

Schwangerschaftswoche	\bar{x} (U/l)	$\bar{x} \pm 2 s$ (U/l)	n
30	59	17–101	9
31	65	33–97	9
32	78	40–116	10
33	87	51–123	7
34	86	38–134	12
35	97	13–181	16
36	107	3–211	13
37	120	22–218	13
38	129	47–211	19
39	139	57–221	28
40	140	40–240	29

Literatur

1. Kuss, E. (1974), *Gynäkologe* 7, 124–150.
2. Tuppy, H., Wiesbauer, Ulrike & Wintersberger, E. (1962), *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 329, 278–288.
3. Wintersberger, E., Müller-Hartburg, W. & Tuppy, H. (1966), *Clin. Chim. Acta* 14, 786–792.
4. van Oudheusden, A. P. M. (1971), *Clin. Chim. Acta* 32, 140–141.
5. van Oudheusden, A. P. M. (1972), *diese Z.* 10, 345–346.
6. Peeters, J. A. B. M. (1972), *Clin. Chem.* 18, 563–564.
7. Tovey, J. E., Dawson, P. J. G., Fellowes, K. P. & Fernandez de Castro, A. (1973), *Clin. Chem.* 19, 756–761.
8. Usategui-Gomez, M., Tarbutton, P. & Yeager, F. (1973), *Clin. Chim. Acta* 47, 409–415.
9. Small, C. W. & Watkins, W. B. (1975), *Clin. Biochem.* 8, 124–132.
10. Reinouts van Haga, P. (1975), *Clin. Chim. Acta* 63, 193 bis 195.

Priv. Doz. Dr. Dr. H. Wisser
Abteilung für Klinische Chemie
Robert-Bosch-Krankenhaus
Auerbachstraße 110
D-7000 Stuttgart 50

